

RECEIVED

MAR 27 2003

TC 1700

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Docket No: Q65805

Kouji HIRAYAMA *et al.*

Appln. No.: 09/933,000

Group Art Unit: 1743

Filed: August 21, 2001

Examiner: L. Alexander

For: TEST APPARATUS FOR ASSAYING A COMPONENT IN A LIQUID SAMPLE

DECLARATION

Assistant Commissioner for Patents

Washington, D.C. 20231

Sir/Madam:

I, Eiichi Kobayashi, do declare and state that:

I graduated from the University of Tokyo, Faculty of Agriculture, Department in Agricultural Chemistry, having received a Master's Degree of Agriculture in March, 1992.

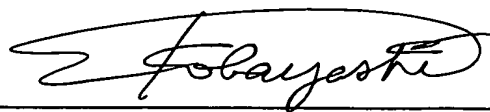
I am presently employed by NGB Corporation of Tokyo, Japan and have been so employed since April, 1992.

I understand the Japanese and English languages. Attachment A is a copy of JP-A-4-188065 and Attachment B is an accurate English translation made by me of Attachment A.

I declare further that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Date: March 12, 2003

Name: _____



Eiichi Kobayashi

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)7月6日

G 01 N 33/52

B

7055-2J

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全4頁)

⑮ 発明の名称 液体試料分析用具および分析方法

⑯ 特 願 平2-319921

⑰ 出 願 平2(1990)11月21日

⑱ 発 明 者 水 谷 智 京都府京都市伏見区深草善導寺町29-10
 ⑲ 発 明 者 内 垣 隆 年 京都府相楽郡山城町大字上狛小字東作り道5番地
 ⑳ 出 願 人 株式会社京都第一科学 京都府京都市南区東九条西明田町57
 ㉑ 代 理 人 弁理士 青山 葆 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

液体試料分析用具および分析方法

2. 特許請求の範囲

1. 液体試料中の特定成分を分析するための用具であって、

支持体、

該支持体に上に固着した試薬層、および

少なくとも該試薬層を覆い、該支持体との間に毛細管室を形成するように該支持体に固定され、試料供給用開口および空気抜き開口を有するカバーからなる用具。

2. 該支持体が小貫通孔を有し、試薬層を固着した光透過性フィルムが該小貫通孔を覆っている請求項1記載の用具。

3. 該光透過性フィルムが多孔性である請求項2記載の用具。

4. 請求項1～3のいずれかに記載の液体試料中の特定成分を分析するための用具を用いて液体

試料中の特定成分を分析する方法であって、液体試料をカバーの試料供給用開口から供給し、試料が供給されたことを毛細管室における光学的变化で検出することを特徴とする分析方法。

5. 液体試料が試薬層を通過したことを毛細管室における光学的变化で検出する請求項4記載の分析方法。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、液体試料、特に全血、血清などの血液試料、尿および髄液のような体液に含まれる成分を分析測定するための分析用具および方法に関する。

[従来の技術と発明が解決しようとする課題]

近年、液体試料、特に血液等の体液中の成分の分析を迅速かつ簡便に行うために、分析用試薬溶液の代わりに、固体支持体に固定した試薬を用いることが有用視されている。

例えば、酸化酵素および過酸化水素を含む検出系をポリマー中に分散させてプラスチックフィル

ムに塗布した耐水性の試験フィルムが、特公昭49-33800号公報に記載されている。この試験フィルムを用いる分析においては、生成した色素をフィルムの試料供給側から測定するので、試料(全血、血清)を試薬層と一定時間接触反応させた後に脱脂綿等で拭き取り除去する必要がある。さらに、試料の拭き取り後、酸素を十分に供給して発色させるために、空气中に一定時間放置しなければならない。

特公昭53-21677号公報には、液体不浸透性透過性支持体上に、試薬層および展開層を設けた多層試験フィルムが開示されている。このフィルムの展開層に試料を点着すると、試料は展開層で広がった後、試薬層に移行する。試薬層において試薬中の成分と試薬とが反応して生成した色素を、光透過性支持体側より測定する。従って、点着した試料除去する必要がある。しかし、試薬層は支持体と展開層に挟まれているため、大気が試薬層に達しにくく、特に試薬層に酸化酵素が含まれている場合、酸素不足により充分な反応を行わ

ない支持体で構成されており、穴の開いた支持体側の試薬層面から酸素が供給され、試料点着の反対側から生成した色素を測定するため、試料を除去する必要がある。また、この分析用具では、測定機と組み合わせて検体点着の自動検出を可能としているので、反応時間測定の正確さと操作の簡便性が著しく向上している。しかし、この検体点着の検出は、生成した色素を測定する面と同一場所の試薬層の光透過性を利用しているため、全血測定の場合、血球の影響を受ける。これを除くために2波長測定が不可欠となり、測定機の構造および補正方法が複雑とならざるを得ない。

本発明は、上記のような従来技術の持つ欠点を解決する液体試料分析用具を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

本発明は、液体試料中の特定成分を分析するための用具であって、支持体、該支持体に固定した光透過性フィルム、該フィルム上に固着した試薬層、および少なくとも該試薬層を覆い、該支持体

せることができなかった。

この欠点を解決するために、特開昭60-82859号公報に、一体型多層化学分析要素が開示されている。この分析要素は展開層と試薬層の間に、酸素透過性蛋白質不透過性光遮断層を有しており、大気と試薬層の接触を向上させている。しかし、試薬層の支持体側は大気と接触できないので、試薬層への酸素の供給は充分とは言えなかった。

特開昭60-205364号公報に開示されている分析用具は、試薬層と支持体との間に多孔質疎水性の酸素供給層を有するので、酸化酵素を含有する試薬層の反応性を著しく向上させることができる。しかし、この酸素供給層は、充分量の酸素を保有するための厚みを有しているため、支持体側からの光透過性が得られず、試料を除去して試料供給側から生成した色素を測定しなければならないという欠点を有する。

特開昭63-101757号公報に開示されている分析用具は、多孔質の試薬層要素と穴の開い

との間に毛细管室を形成するように該支持体に固定され、試料供給用開口および空気抜き開口を有するカバーからなる用具、および本発明の液体試料分析用具を用いて液体試料中の特定成分を分析する方法であって、液体試料をカバーの試料供給用開口から供給し、試料が試薬層を通過したことを検出することにより試薬層への試料供給タイミングを検知することを特徴とする分析方法を提供する。

本発明の液体試料分析用具は、試薬液を塗布および乾燥した光透過性フィルム、好ましくは光透過性多孔性フィルムを、支持体の上、好ましくは支持体に設けた小貫通穴、通常直径2~10mmの穴を覆うように配置して支持体上に固定し、次いでカバーを支持体に固定する。その際、カバーと支持体および試薬層との間に毛细管室が形成されるように、カバーを支持体および試薬層から少し離して固定する。カバーと支持体または試薬層との距離は、任意であるが、あまり大きいと毛细管現象により試料が迅速に展開されず、逆に小さす

ぎると、試料の表面張力や粘性により試料が展開しにくくなる。通常、その距離は、0.05～0.5mmであり、好ましくは0.1～0.3mmである。

光透過性フィルムおよびカバーの支持体への固定は、たとえば熱可塑性樹脂を用いて熱圧着するか、または両面テープを用いて行うことができる。

カバーには、試料供給用の開口と毛細管室内の空気を排出する為の開口とが、試薬層をはさんでそれぞれ設けられている。この2つの開口は、カバーに空けられた穴であってもよいが、カバーの一部を切り欠いて設けたスリットでもよい。

本発明に使用する光透過性フィルムおよび試薬層の構成は、特開平2-150751号公報およびEP-A-371513に記載のものと同じであってよい。

本発明の液体試料分析用具の1つの態様を、添付図面を参照して説明する。

第1図は、本発明の液体試料分析用具の拡大断面図である。

分析用具は、小貫通穴を有する光透過性の支持

体1、貫通穴11を覆って支持体に固定した光透過性多孔性フィルム2、多孔性フィルム2の支持体に接していない側の面上に固着した試薬層3、および少なくとも試薬層3を覆い、支持体1との間に毛細管室4を形成するように支持体1に固定したカバー5からなる。

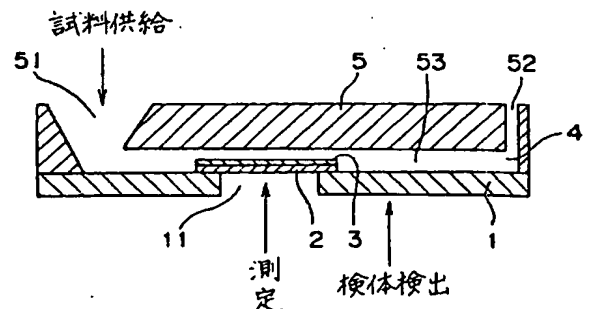
カバー5は、試料供給用穴51および空気排出口52を有しており、試料供給用穴51から供給された試料は、毛管作用、重力流動作用で試薬層を濡らしながら試料検知部53へ速やかに展延する。このため、専用の測定機にセットして測定すれば、試料点着とほぼ同時(約1秒後)に、試料検知部53への試料の展延を第1図の検出位置における光反射率の変化によって検知すると、測定機のタイマーが作動して、一定時間後に自動的に測定が開始され、測定結果が得られる。また、本発明の構造では、試薬層側から測定する必要はないので、試薬層を光不透過性とすることができ、また、血球の影響を受けないので、測定機を簡単にできる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の液体試料分析用具の一態様の拡大断面図である。

図面の浄書(内容に変更なし)

第1図



特許出願人 株式会社京都第一科学
代理人 弁理士 青山 藤 ほか1名

手続補正書

平成 3 年 1 月 1 7 日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成 2 年 特許願 第319921号



2. 発明の名称

液体試料分析用具および分析方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 株式会社京都第一科学

4. 代 理 人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号
ツイン21 MIDタワー内 電話(06)949-1261

氏名 弁理士 (6214) 青 山 茂



5. 補正命令の日付

自 発

6. 補正の対象

委任状および図面

7. 補正の内容

別紙の通り (図面は浄書を提出します。内容に変更なし。)

月 式 査
委 査



B

SPECIFICATION

1. Title of the invention

Device and method for analyzing liquid sample

2. Scope of the claims

1. A device for analyzing a liquid sample comprising a support, a reagent layer provided on said support and a covering which covers at least said reagent layer, is fixed to said support to form a capillary room between said covering and said support and has an opening for supplying a sample and an air outlet opening.

2. The device according to claim 1, wherein said reagent layer is formed on a transparent film and said film is fixed to said support.

3. The device according to claim 2, wherein said transparent film is a porous film.

4. A method for analyzing a liquid sample using a device for analyzing a liquid sample according to any one of claims 1 to 3, which method comprises supplying a liquid sample from an opening for supplying a sample in the covering and optically detecting passage of said liquid sample through the capillary room to determine the sample supply timing.

5. The method according to claim 4, wherein passage of said liquid sample over said reagent layer is optically detected.

3. Detailed description of the invention

[Industrial application field]

The present invention relates to a device and a method for analyzing a liquid sample, in particular, for analyzing a component or components contained in a body liquid including a blood sample such as a whole blood or serum, urine and liquor cerebrospinalis.

[Background art and problems to be solved by the invention]

Recently, to quickly and simply analyze a component or components in a liquid sample, in particular, a body liquid such as blood, it is considered useful to use a reagent fixed on a solid support in place of a reagent solution for analysis.

For example, Japanese Patent Publication No. 33800/1974 discloses a water-resistant test film comprising a plastic film carrying a reagent layer which comprises a polymer and a detection system including an oxidase and hydrogen peroxide dispersed in the polymer. In the analysis using this test film, since a

generated pigment is measured from a side from which the sample is supplied, the sample such as the whole blood or the serum should be wiped off with absorbent cotton after contacting the sample with a reagent layer for a certain time period. In addition, in order to supply a sufficient amount of oxygen to the reagent layer to develop a color, the test film should be kept in air for a specific time period after wiping off the sample.

Japanese Patent Publication No. 21677/1978 discloses a multi-layer test film comprising a liquid-impermeable transparent support, a reagent layer formed on the support and a spreading layer formed on the reagent layer. When a liquid sample is spotted on the spreading layer, it spreads in the spreading layer and then migrates into the reagent layer. When a pigment is generated through a reaction between a reagent in the reagent layer and a component in the sample, it is measured from the transparent support side, and then the wiping off of the sample is not necessary. However, since the reagent layer is sandwiched between the spreading layer and the support, oxygen in the air hardly reaches the reagent layer. In particular, when the reagent layer contains an oxidase, a sufficient reaction cannot take place due to shortage of oxygen.

To overcome such defects, Japanese Patent Kokai Publication No. 82859/1985 proposes an integral type multilayer chemical analytical element. This analytical element has an oxygen-permeable protein-impermeable light-shielding layer between the spreading layer and the reagent layer, whereby contact of the reagent layer to air is facilitated. However, since a surface of the reagent layer on the support side cannot contact to the air, a sufficient amount of oxygen is not supplied to the reagent layer.

An analytical element disclosed in Japanese Patent Kokai Publication No. 205364/1985 has a hydrophobic porous layer for supplying oxygen between the reagent layer and the support, whereby the reaction in the reagent layer containing the oxidase is greatly facilitated. Since this oxygen-supplying layer has a relatively large thickness for keeping a sufficient amount of oxygen therein, transparency from the support side is not achieved, so that the generated pigment should be measured from the sample-supply side after wiping off the sample.

An analytical element disclosed in Japanese Patent Kokai Publication No. 101757/1988 comprises a porous reagent layer element and a support having perforations. Oxygen is supplied from a surface of the reagent layer on the perforated support side, and the generated pigment is measured from a side opposite to the sample supply side. Therefore, it is not necessary to wipe off the sample. Since it is

possible to automatically detect the supply of the sample on the analytical element when a measuring apparatus is used in combination with this analytical element, accuracy of the reaction time measurement and simplicity of measurement are greatly increased. Since the supply of the sample is detected using the transparency of the reagent layer at the same place as the generated pigment is measured, the measurement is influenced by hemocytes when the whole blood is to be analyzed. To remove the influence of the hemocytes, the measurement should be done by a double wavelength method, so that a structure of the measuring apparatus and a correction method become complicated.

An object of the present invention is to provide a device and a method for analyzing a liquid sample, which can solve the drawbacks of the above described prior arts.

[Means to solve the problems]

The present invention provides a device for analyzing a liquid sample comprising a support, a reagent layer provided on said support and a covering which covers at least said reagent layer, is fixed to said support to form a capillary room between said covering and said support and has an opening for supplying a sample and an air outlet opening, and a method for analyzing a liquid sample using the device for analyzing a liquid sample of the present invention, which method comprises supplying a liquid sample from an opening for supplying a sample in the covering and detecting passage of said liquid sample over said reagent layer to determine the sample supply timing.

In the device for analyzing a liquid sample according to the present invention, preferably a reagent solution is applied on a transparent film, preferably a transparent porous film and then dried to form a reagent layer, and the transparent film carrying the formed reagent layer is fixed on a support, preferably over a small hole formed in the support. Generally, the hole has a diameter of 2 to 10 mm. Then, the covering is fixed to the support. According to the present invention, the covering is slightly apart from the support and the reagent layer, so that the capillary room is formed between the covering and the reagent layer. A distance between the covering and the support or the reagent layer is not critical. However, if this distance is too large, the sample cannot be quickly spread in the capillary room by capillarity. If this distance is too small, smooth spreading of the liquid sample is prevented by a surface tension and a viscosity of the liquid sample. Usually, a distance between the covering and the support or the reagent layer is from 0.05 to 0.5 mm, preferably from 0.1 to 0.3 mm.

The transparent film and the covering can be fixed to the support by thermocompression bonding with the use of a thermoplastic resin, or with a double-coated adhesive tape.

The covering has an opening for supplying the liquid sample and an air outlet opening on the respective sides of the reagent layer. These two openings may be formed by perforating the covering, or may be slits formed by cutting out respective parts of the covering.

The transparent film and the reagent layer may have the same structures as those disclosed in Japanese Patent Kokai Publication No. 150751/1990 and EP-A-371 513.

Now, one preferred embodiment of the device for analyzing a liquid sample according to the present invention will be explained by making reference to the accompanying Figure 1.

Figure 1 schematically show a cross section of the device for analyzing a liquid sample according to the present invention.

The device shown in Figure 1 comprises a transparent support 1 having a small hole 11, a transparent porous film 2 fixed to the support 1 with covering the hole 11, a reagent layer 3 which is formed on a film surface which does not contact to the support, and a covering 5 which covers at least the reagent layer 3 and is fixed to the support 1 in such way that a capillary room 4 is formed between the covering 5 and the support 1.

The covering has an opening 51 for supplying the liquid sample and an air outlet opening 52. When the liquid sample is supplied from the opening 51, it quickly spreads to a sample detection section 53 with wetting the reagent layer 3 by the capillarity and the gravitational flow effect. Accordingly, when the device of the present invention is set in a suitable measuring apparatus and the liquid sample is analyzed, at substantially the same timing as spotting of the sample (only one second later), the spreading of the sample to the sample detecting section 53 is detected through change of light reflectance at a sample detection point in Figure 1. Then, a timer of the measuring apparatus is automatically actuated and, after a specific time period, the measurement is automatically started to give results. In the present invention, since it is not necessary to make measurement from the reagent side, the reagent layer can be opaque. In addition, since the measurement is not influenced by the hemocytes, the measuring apparatus can be made simple.

4. Brief explanation of the drawing

Figure 1 schematically show a cross section of one embodiment of the device for analyzing a liquid sample according to the present invention.

Figure 1

